

CZ

Návod k použití

HISTO TYPE SSP Kits

IVDElektronická verze Návodu k použití je ke stažení na www.bag-diagnostics.comTestovací soupravy pro tkáňovou typizaci HLA alel na molekulárně genetickém základě
(třída I: HLA-A, B, C, třída II: HLA-DR, DQ)

prealiquotováno a připraveno k použití

REF 70721	HISTO TYPE A low	CE 0123
REF 70731	HISTO TYPE B low	
REF 70751	HISTO TYPE DR low	
REF 7098	HISTO TYPE ABDR	
REF 7102	HISTO TYPE ABC	
REF 7103	HISTO TYPE DR/DQB	
REF 7070	HISTO TYPE B27 low	
REF 7071	HISTO TYPE B27 low	
REF 70941	HISTO TYPE Celiac Disease	
REF 70715	HISTO TYPE B*57:01/B*51	
REF 70716	HISTO TYPE Narcolepsy	
REF 70741	HISTO TYPE C low	CE
REF 70891	HISTO TYPE DQB low	
REF 709010	HISTO TYPE DQB high	

Verze: 20/2020 / Publikováno 2020-08 | Změny oproti verzi 19/2019 označeny žlutě!

OBSAH

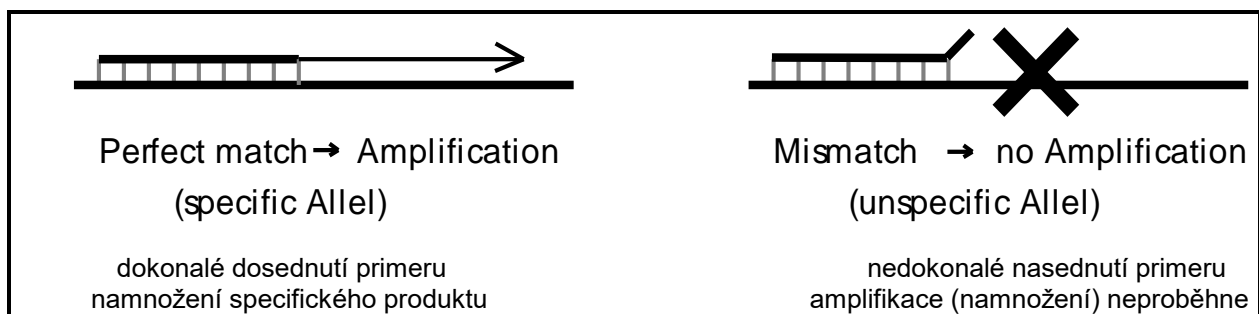
1. Popis výrobku	3
1.1 Krátký úvod k HISTO TYPE Celiac Disease	3
1.2 Krátký úvod k HISTO TYPE B57:01/B*51	3
1.3 Krátký úvod k HISTO TYPE Narcolepsy	3
1.4 Krátký úvod k HISTO TYPE B27	4
2. Materiál	4
2.1 Obsah souprav HISTO TYPE / DNA-SSP	4
2.2 Další potřebné vybavení a reagensie	4
2.3 Skladování a stabilita	5
3. Výkonnost testu	5
4. Provedení testu	5
4.1 Bezpečnost práce a speciální poznámky	5
4.2 Izolace DNA	6
4.3 Amplifikace	6
4.4 Gelová elektroforéza	8
4.5 Dokumentace a interpretace výsledků	9
5. Varování a bezpečnostní opatření	9
6. Řešení problémů	10
7. Literatura	11
8. Vysvětlení symbolů použitých na etiketách	12

1. Popis výrobku

Soupravy HISTO TYPE Kits jsou určeny na typizaci HLA na molekulárně genetickém základě (informace o soupravách pro typizaci onemocnění asociovaných s HLA alelami jsou uvedeny v kapitole 1.1, 1.2, 1.3 a 1.4).

Základním materiálem pro práci s **HISTO TYPE SSP soupravami** je purifikovaná DNA. Při práci s těmito soupravami se využívá metoda SSP (Sequence Specific Primers) – PCR. (viz. Obr. 1) [2,3]. Ta je založena na poznatku, že prodlužování primerů, a tím i úspěšná PCR, je závislé na přesné shodě 3' konců obou primerů s templátovou DNA. A tedy pouze přesné usazení obou primerů na cílovou sekvenci vede k získání produktu, který je pak identifikován při gelové elektroforóze.

Obr. 1 Princip SSP-PCR



Složení jednotlivých směsí primerů umožňuje jasnou HLA typizaci pomocí vyhodnocovacích diagramů a tabulek. Každá typizace je prováděna pomocí určitého množství **prealiquotovaných a vysušených** reakčních směsí obsahujících také vnitřní amplifikační kontrolu, přičemž celkový objem reakce je 10µl.

1.1 Krátký úvod k soupravě HISTO TYPE Celiac Disease

Celiakie je autoimunní reakce proti glutenu, který je součástí mnoha obilovin. Pokud není diagnostikována v raném stadiu, vede k chronickému zánětu a poškození tenkého střeva. Celiakie je silně asociována s HLA alelami DQA1*05:01-DQB1*02:01 a DQA1*03-DQB1*03:02 haplotypem. Navíc lze jako genetické markery využít i alely DR3, DR7 a DR11. [8-10]

1.2 Krátký úvod k soupravě HISTO TYPE B*57:01/B*51

Léčba antiretrovirálními preparáty (např. při HIV terapii) obsahujícími aktivní látku Abacavir je možná pouze tehdy, pokud je u pacienta vyloučena HLA alela B*57:01. Důvodem je riziko hypersenzitivní reakce, která je asociována s touto alelou. [11-13]

Bechcetova choroba je chronická vaskulitida projevující se vřídky v ústech a na genitáliích, očními a kožními projevy a řadou dalších systémových poruch. Bechcetova choroba je rozšířena v pásu od východní Asie po Středomoří. HLA B*51 je pro toto onemocnění silným rizikovým faktorem a její průkaz lze použít jako diagnostický nástroj. [14]

1.3 Krátký úvod k soupravě HISTO TYPE Narcolepsy

Narkolepsie je spánkové onemocnění se symptomy jakými jsou např. časté denní usínání, spánková paralýza a halucinace. 98 % narkoleptických pacientů z kavkazské rasy má HLA DRB1*15:01 – DQA1*01:02 – DQB1*06:02 haplotyp. HLA typizace tudíž umožňuje potvrzení nebo vyvrácení diagnózy. [15-17]

1.4 Krátký úvod k soupravě HISTO TYPE B27

Asociací mezi HLA alelami a některými nemocemi je popsáno více než 40. Velmi důležitou se jeví vazba mezi HLA-B27 a chorobami typu séronegativní artritidy. (Bechtěrevova choroba, Reiterův syndrom, reaktivní artritida). Pozitivní výsledek HLA-B27 testu ukazuje na velmi vysoké riziko těchto chorob (viz Tabulka 1) [17,18]. Nejdůležitějším příspěvkem k léčbě je potvrzení HLA-B27 u pacientů s nejasným klinickým obrazem a podezřením na Bechtěrevovu chorobu.

Onemocnění	Frekvence B27 u pacientů	Relativní riziko
Ankylozující spondylitida (Bechtěrevova choroba)	90,2%	91
Reiterův syndrom	78,8%	37,6
Post infekční reaktivní artritida	70,2%	

Tabulka 1: HLA-B27 frekvence a riziko

2. Materiál

2.1 Obsah souprav HISTO TYPE SSP kits

- HISTO TYPE destičky nebo stripy pro HLA typizaci. Předkapané, prealiquotované reakční směsi obsahují specifické primery, vnitřní kontrolu (specifickou pro lidský gen G3PDH) a směs nukleotidů. První reakční směs je označená šipkou (viz schéma na str. 7). U většiny souprav HISTO TYPE je na první nebo poslední pozici kontaminační kontrola. Lze ji identifikovat na základě jejího zbarvení (modrá reakční směs). Číslo šarže je vytištěno na každém stripu/destičce.
 - PCR stripy (po osmi) obsahující kontaminační kontrolu s vnitřními kontrolními primery a amplikon specifickými primery (pokud souprava obsahuje kontaminační kontrolu - viz výše, není přikládána samostatně, a není také u souprav HISTO TYPE B27 low).
 - 10xPCR pufr.
 - Víčka ke stripům nebo PCR folie.
 - Informační CD (obsahující návod k použití pro soupravy HISTO TYPE a software HISTO MATCH**, tabulku vztahů alel a mixů (hit table)*, pracovní list*, seznam netestovaných primerů, šaržový soubor pro práci v HISTO MATCH** a SCORE*, certifikát kontroly kvality).
- *nedodává se pro HISTO TYPE B27 low / **nedodává se pro HISTO TYPE B27 low a HISTO TYPE Narcolepsy

2.2 Další potřebné vybavení a reagentie

- Happy Taq (kat.č. 70976), (nebo jiná Taq polymeráza validovaná se soupravami HISTO TYPE uživatelem).
 - Soupravy HISTO TYPE budou dodávány zdarma s potřebným množstvím Happy Taq polymerázy.
- Nepoužívejte, prosíme, Hot-Start polymerázu!**
- **BAG EXTRA GENE I Kit** (kat.č. 7059) pro extrakci DNA z krve / lymfocytů / leukocytů. Nebo jiná souprava na DNA izolaci.
 - Pipety (0,5 – 250 µl)
 - Sterilní špičky s integrovaným filtrem
 - DNA cyklér (seznam validovaných cyklérů viz kapitola 4.3).

Vybavení pro gelovou elektroforézu

- Agaróza pro separaci DNA
- 0,5xTBE pufr (45 mM Tris, 45 mM kyselina boritá, 0,5 mM EDTA)
- Ethidium bromid (EtBr)
- Jednotka na gelovou elektroforézu DNA
- Zdroj napětí (200-300V, 200mA)
- DNA délkový standard (kat. č. 7097)

Vybavení pro interpretaci a dokumentaci výsledků

- Zdroj UV záření (220-310 nm)
- Fotografický přístroj (např. Polaroid) s filmem (např. Polaroid typ 667) nebo video systém s termo-papírem (např. typ KP65HM-CE)
- K interpretaci lze využít PC se software HISTO MATCH (BAG Health Care) nebo SCORE (plnou verzi)

2.3 Skladování a stabilita

Soupravy HISTO TYPE jsou dodávány nezmrazené při pokojové teplotě. Po obdržení skladujte veškeré reagenty v temnu při $\leq -20^{\circ}\text{C}$. HISTO TYPE stípy/destičky mohou být skladovány při $2^{\circ}\text{C} \dots 8^{\circ}\text{C}$, ale je třeba zabránit častým změnám teploty. 10x PCR buffer musí být skladován při $\leq -20^{\circ}\text{C}$.

Happy Taq polymeráza se dodává na suchém ledu nebo s chladicími vložkami. Po obdržení skladujte polymerázu Happy Taq při $< -20^{\circ}\text{C}$. Skladujte v zařízení s monitoringem teploty.

Datum expirace je uvedeno na štítku na každé reagentii a je platné i pro reagentie po prvním otevření. Datum expirace uvedené na obalu soupravy odpovídá reagentii s nejkratší dobou trvanlivosti.

3. Výkonnost testu

Uspořádání reakčních směsí zaručuje hodnověrnou identifikaci HLA typů podle evaluačních diagramů (založeno na posledních sekvenčních datech). Aktualizace dat se provádí a bude nadále pravidelně provádět.

Pro každou šarži byla každá směs primerů testována pomocí DNA z referenčních vzorků. Alely, které nejsou zahrnuty a/nebo z důvodů jejich veliké vzácnosti netestovány, jsou vyznačeny v evaluačních diagramech a tabulkách specifit.

Studie výkonnosti testu byly prováděny s každou soupravou HISTO TYPE s minimálně 30ti vzorky. Srovnání s výsledky SSP testů jiného výrobce neukázalo žádné rozdíly. Evaluace a kontrola kvality směsí byla prováděna se vzorky DNA získanými pomocí soupravy EXTRA GENE I (vysolovací metoda), nebo souprav Qiagene (kolonková metoda). Pokud je použita jiná souprava pro extrakci DNA, musí být vhodnost extrahované DNA pro aplikaci se soupravami HISTO TYPE validována uživatelem.

Soupravy HISTO TYPE jsou validované s polymerázou Happy Taq (kat.č. 70976). Při použití jiné Taq polymerázy musí uživatel validovat použití dotyčného enzymu se soupravami HISTO TYPE sám. Hodnověrné výsledky jsou zaručeny při obsahu DNA 25-50 ng na reakční směs.

4. Provedení testu

4.1 Bezpečnost práce a speciální poznámky

PCR je obzvláště citlivá metoda a měla by být prováděna dobře vyškolenými pracovníky se zkušenostmi v molekulárně-biologické práci a v testování histokompatibility. Dodržováním transplantačních směrnic a standardů EFI minimalizujete nebezpečí chybných typizací, obzvláště pak při neshodě sérologických a molekulárně-biologických výsledků.

Aby během pracovního postupu nedošlo ke kontaminaci a tím i chybným výsledkům, je nezbytné dodržovat následující:

- Při práci používejte rukavice (pokud možno bez pudru).
- Pro každé pipetování berte novou špičku (s integrovaným filtrem).
- Vyhraďte oddělená pracovní místa pro pre-amplifikační (izolace DNA, příprava reakcí) a post-amplifikační (elektroforéza, dokumentace) část procesu. Kde je to možné, používejte oddělené místnosti.
- Nepoužívejte pipety a jiné pracovní pomůcky na více pracovních místech, nepřenášejte je. Používejte každou sadu pomůcek na jednom pracovním místě pro ni určeném.

4.2 Izolace DNA

Souprava **BAG EXTRA-GENE I** je nejvhodnějším nástrojem k izolaci, neboť čistá DNA je získána z plné krve v krátkém čase a bez použití toxických chemikálií či rozpouštědel. I jiné metody, jako jsou komerční kolonkové metody, extrakce pomocí partikulí nebo metody popsané v literatuře jsou použitelné pro získání DNA vhodné kvality. Přítomnost heparinu ve vzorku může blokovat PCR [6] a tedy vhodným materiálem pro typizaci je EDTA nebo citrátová krev.

Validované metody extrakce DNA:

- BAG EXTRA-GENE I
- QIAGEN QIAamp DNA Blood Mini and Maxi Kit

Standardní laboratorní metodu izolace DNA by měl validovat uživatel.

DNA by měla mít následující indexy čistoty:

- poměr extinkcí $OD_{260}/OD_{280} = > 1,5$ a $< 2,0$ (indikátor pro kontaminaci RNA/proteiny)
- poměr extinkcí $OD_{260}/OD_{230} = > 1,8$ (indikátor kontaminace solemi, uhlovodíky a organickými rozpouštědly)

4.3 Amplifikace

Veškeré prealiquotované a vysušené reakční směsi již obsahují primery specifické pro danou alelu, stejně jako kontrolní primery a nukleotidy. Dodávány jsou vysušené na dně reakční zkumavky. Amplifikační parametry jsou nastaveny na celkový objem reakce 10 μ l.

1. Nechte těsně před použitím roztát 10x PCR pufr.
2. Vyjměte odpovídající počet HISTO TYPE HLA-SSP destiček nebo stripů z krabice.
3. Připravte Master-Mix z 10xPCR pufru, roztoku DNA, Taq-polymerázy a čisté destilované vody a dobře ho promíchejte. Veškeré HISTO TYPE SSP soupravy pracují se stejným Master-Mixem a ten tedy může být používán se všemi soupravami. Složení Master-Mixu závisí na počtu reakčních směsí tak, jak je uvedeno v tabulce 1 (viz níže).

Při použití soupravy **HISTO TYPE B27** doporučujeme připravit roztok Taq polymerázy ve vodě.

0,08 μl	Taq polymeráza (5 U/ μ l)	x (počet testů + 1)
1,0 μl	10 x PCR pufr	x (počet testů + 1)
7,0 μl	H ₂ O	x (počet testů + 1)

Prosíme promíchejte pečlivě směs a přidejte **8 μ l** do každé reakční zkumavky a doplňte **2 μ l roztoku DNA** (12,5-25 ng/ μ l).

V případě, že má být prováděna **kontaminační kontrola**, připravte Master-Mix bez DNA a napipetujte 10 μ l této směsi do kontaminační kontroly (značena modře). Poté přidejte DNA do zbývajících Master-Mixu a rozdělte ho do jednotlivých reakčních zkumavek.

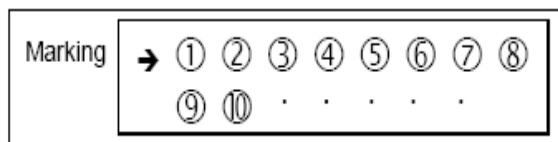
Tabulka 1: Složení Master-Mixu v závislosti na počtu reakčních směsí.

Počet směsí	Destil. H ₂ O	10xPCR pufr	Roztok DNA (25-50 ng/μl)	Happy Taq-polymeráza (5U / μl)	Celkový objem
1	8	1	1	0,08	10 μl
4	63	8	8	0,6	80 μl
8	79	10	10	0,8	100 μl
24	222	28	28	2,2	280 μl
30	269	34	34	2,7	340 μl
32	285	36	36	2,9	360 μl
48	412	52	52	4,2	520 μl
54	459	58	58	4,6	580 μl
56	475	60	60	4,8	600 μl
72	618	78	78	6,2	780 μl
80	681	86	86	6,9	860 μl
96	808	102	102	8,2	1020 μl

⇒ Množství DNA by mělo být 25-50ng na 1 reakční směs (mix). Pro jiné koncentrace DNA je třeba změnit objem DNA roztoku a H₂O (např. pro 24 reakčních směsí: 14 μl DNA roztoku (100 ng/μl) a 236 μl dest.H₂O)

⇒ Pokud je použita jiná Taq polymeráza, musí uživatel sám validovat použití tohoto enzymu se soupravami HISTO TYPE.

4. Po promíchání na Vortexu přidejte okamžitě **10μl** této směsi do předkapaných reakčních směsí ve stripech. Vyměňujte špičku po každém pipetování. Pevně uzavřete mikrozkušavky víčky nebo fólií. Nedotýkejte se vnitřní strany víček, ani horních okrajů mikrozkušavek prsty, abyste maximálně omezili kontaminaci. U cyklérů s těsně uzavíratelnými víky lze použít i PCR kryty k opakovanému použití. Lehce sklepněte destičkou dolů, tak aby se Master-Mix dostal ke zbytku reagensií na dně mikrozkušavky a rozpustil modrý pelet. Veškeré PCR reagensie by měly být na dně.



Poznámka pro HISTO TYPE B*57:01/B*51:

Pokud chcete typovat pouze B*57:01 nebo pouze B*51, dejte MasterMix pouze do odpovídajících reakcí (specifitu reakcí naleznete v tabulce specifit na příloženém CD).

5. Vložte reakční mikrozkušavky do cykléru a upevněte těsně víko, aby se mikrozkušavky v průběhu PCR neotevřely. Nastavte a spusťte PCR program. Překrytí minerálním olejem **není** u cyklérů s vyhřívaným víkem nutné.

Parametry amplifikace

Krok programu	Teplota	Čas	Počet cyklů
První denaturace	96°C	5 min.	1
Denaturace	96°C	20 sec.	5
Annealing + extenze	68°C	1 min.	
Denaturace	96°C	20 sec.	10
Annealing	64°C	50 sec.	
Extenze	72°C	45 sec.	
Denaturace	96°C	20 sec.	15
Annealing	61 °C	50 sec.	
Extenze	72°C	45 sec.	
Závěrečná extenze	72°C	5 min.	1

Validované typy cyklérů:

PTC 100/200/ C1000 (MJ
Reserch/BioRad)

GeneAmp PCR-System 9600/9700
(použijte faktor ohřevu 9600) Veriti
(ABI)

Mastercycler epGradient S
(použijte funkci "simulate Mastercycler
gradient") (Eppendorf)

Tprofessional (Biometra)

Prosíme, nepoužívejte hliníkové bloky (jako např. GeneAmp PCR system 9600/9700).

Při použití cyklérů umožňujících velmi rychlé ohřívání a chlazení doporučujeme nastavit pomalejší ohřívání a chlazení (cca 2,5 °C/s).

Vzhledem k faktu, že cykléry od různých výrobců se liší svými parametry reakce a někdy i jednotlivé přístroje jednoho typu mohou být různě kalibrovány, může být někdy nutné optimalizovat amplifikační parametry. Pokud jsou použity jiné modely než výše uvedené cykléry, musí si je uživatel validovat sám.

K dosažení optimalizace vašeho přístroje postupujte následujícím způsobem:

- Při **falešně pozitivních** výsledcích (nespecifické proužky, nadbytečné typy): zvyšujte teplotu annealingu v 1°C krocích.
- Při **falešně negativních** výsledcích (absence proužků): snižujte teplotu annealingu v 1°C krocích a/nebo zvyšujte dobu trvání annealingu v 5ti vteřinových krocích a/nebo zvyšujte dobu trvání denaturace v 5ti vteřinových krocích.

Doporučujeme používat pouze pravidelně kalibrované cykléry.

Pro kalibraci je velmi vhodný BAG-CyclerCheck (kat.č. 7104, 71044).

Testy kontroly kvality byly prováděny na cyklérech PTC-200 resp. C1000 (MJ Research/BioRad), 9700 (ABI) a Mastercycler epGradient S (Eppendorf) a Tprofessional (Biometra).

4.4 Gelová elektroforéza

Separace amplifikačních produktů se provádí pomocí gelové elektroforézy na horizontálním agarózovém gelu. Doporučeným pufrům pro elektroforézu je 0,5 x TBE (45 mM tris, 45 mM kyselina boritá, 0,5 mM EDTA). Koncentrace gelu by měla být 2,0-2,5% agarózy. Před vnesením vzorků nechte gel polymerizovat alespoň 30 minut. Po ukončení amplifikace vyjměte vzorky z cykléru a vnešte celý reakční objem vzorku opatrně do odpovídající jamky v gelu. Dále přidejte 10 µl DNA délkového standardu, tak aby bylo možno odečíst délku produktů amplifikace. Elektroforetická separace se provádí při 10-12 V/cm (např. při 20cm vzdálenosti elektrod přibližně 200-240 V) po dobu 20-40 minut. Po ukončení běhu proveďte barvení celý gel v roztoku ethidiumbromidu (EtBr) (0,5 µg/ml EtBr ve vodě nebo TBE pufru) po dobu 30-40 minut. Jinou možností je přidat EtBr (0,5 µg/ml) do elektroforetického pufru nebo přímo do gelu. Pokud je to nutné, lze odstranit přebytečný EtBr z gelu máčením ve vodě nebo 0,5xTBE po dobu 20-30 minut.

4.5 Dokumentace a interpretace výsledků

K zobrazení výsledků prosvitte gel UV transiluminátorem ($\lambda=220-310$ nm) a vyfotografujte výsledek vhodným fotografickým přístrojem. Ideálním je digitální fotografie, ale lze použít i klasický fotoaparát nebo systém Polaroid (film 667), nebo video systém s termo-papírem KP65HM-CE). Nastavte čas a expozici tak, aby jednotlivé proužky byly vykresleny ostře a stály jasně proti tmavému pozadí (např. clona 11, exp. čas 1s).

Pro interpretaci výsledků použijte odpovídající vyhodnocovací diagram nebo tabulku specificit (viz Informační CD). Pouze proužky s odpovídající délkou fragmentu (měřeno dle DNA délkového standardu) jsou považovány za pozitivní. Správné délky jsou uvedeny v tabulkách a vyhodnocovacích diagramech.

U souprav HISTO TYPE B27, má specifický proužek délku 420 bp a/nebo 85 bp.

U ostatních souprav musí být v každé pozici při nepřítomnosti specifického proužku přítomna **1070bp** dlouhá vnitřní kontrola (u soupravy **BAG HISTO TYPE Celiac Disease je kontrola 1070bp / 425bp**). Ve většině případů je proužek vnitřní kontroly v přítomnosti specifického proužku slabý nebo zcela chybí!

Pokud se neobjeví ani specifický proužek ani interní kontrola, výsledky s touto reakční směsí nemohou být použity pro vyhodnocení. Možné příčiny neinterpretovatelných výsledků najdete v kapitole 6 - Řešení problémů.

V **kontaminační kontrole** by neměl být patrný žádný proužek. Pokud došlo ke kontaminaci genomickou DNA, bude přítomen proužek o délce 282 bp. Další proužky se mohou vyskytovat v pozicích 78 bp, 104 bp, 176 bp a 580 bp. V případě kontaminace amplifikáty budou patrné proužky o délce 78 bp a/nebo 104 bp a/nebo 176bp a nebo 282bp a nebo 580bp.

Vyhodnocení provádějte pomocí softwaru HISTO MATCH (zdarma od BAG Diagnostics) nebo SCORE (plná verze), (s výjimkou HISTO TYPE B27 low a HISTO TYPE Narcolepsy). Soubory pro evaluaci jsou k dispozici na příloženém CD, též je lze získat z download serveru (<http://service.bag-diagnostics.com>) nebo od našeho zákaznického oddělení (telefon: +49 (0) 6404-925-125, v ČR: +420 286 840 508).

5. Varování a bezpečnostní opatření

Ethidiumbromid je silný mutagen. Při práci s gely nebo roztoky obsahujícími EtBr používejte rukavice. Postupujte podle návodu a bezpečnostních instrukcí výrobce! Transiluminátor vyzařuje velmi krátkovlnné UV záření, které může spálit kůži a sítnici. Používejte ochranný UV obličejový štít!

Veškerý materiál použitý pro extrakci DNA, tj. krev, tkáň atd., je třeba považovat za potenciálně infekční. Při práci s biologickým materiálem dodržujte standardní bezpečnostní opatření (nepipetujte ústy, používejte jednorázové rukavice, dezinfikujte ruce po ukončení práce).

Veškerý biologický materiál musí být po práci inaktivován (např. ve sterilizátoru). Stejně tak i veškeré jednorázové pomůcky.

Rozlitý potenciálně infekční materiál musí být odstraněn okamžitě a kontaminovaná místa očištěna standardním dezinfekčním prostředkem nebo 70% alkoholem. Materiál použitý k čištění je třeba inaktivovat (např. ve sterilizátoru) před jeho likvidací.

Veškerý odpad, zbytky vzorků a reagentií musí být likvidovány v souladu s platnou národní legislativou. Bezpečnostní listy (MSDS) jsou ke ztažení na www.bag-diagnostics.com.

6. Řešení problémů








Problém	Možný důvod	Řešení
žádná amplifikace, délkový standard viditelný	DNA kontaminovaná inhibitory PCR	opakujte izolaci DNA, použijte jinou metodu
	koncentrace DNA je příliš vysoká/nízká	změňte koncentraci DNA, opakujte izolaci DNA
	chybí enzym nebo je jeho koncentrace příliš nízká	opakujte PCR, změňte koncentraci enzymu
	DNA z heparinované krve	opakujte práci s EDTA, nebo citrátovou krví
	špatné amplifikační parametry	optimalizujte amplifikační parametry (viz 4.3) *
opakované chyby v jednotlivých reakčních liniích (chybí amplifikační kontrola)	netěsnící reakční mikrozkušavky, ztráta vody a změny koncentrace v průběhu PCR	uzavírejte mikrozkušavky těsně, použijte jiné mikrozkušavky
nespecifické amplifikační produkty, nadbytečné proužky (dodatečné proužky špatných velikostí musí být zanedbány)	kontaminace produkty amplifikace	opakujte test, zajistěte přesnou práci
	DNA kontaminována solemi	opakujte izolaci DNA, použijte jinou metodu
	příliš vysoká koncentrace DNA	použijte méně DNA
	příliš vysoká koncentrace enzymu	použijte méně enzymu
	špatné parametry amplifikace	optimalizujte amplifikační parametry (viz. 4.3)*
při interpretaci výsledky ukazují na víc než dvě specifity	kontaminace přenosem amplifikačních produktů nová alela	otestujte typizační směs bez přidání DNA zajistěte přesnou práci
žádné, nebo pouze slabé proužky, délkový standard není vidět	slabé barvení EtBr	opakujte barvení
pozadí gelu svítí příliš silně	příliš dlouhá doba barvení, příliš vysoká koncentrace EtBr	máčejte gel ve vodě nebo v TBE snižte koncentraci EtBr
rozmazané proužky	elektroforetický pufr je příliš horký špatný elektroforetický pufr nedostatečná polymerizace gelu	snižte napětí použijte 0,5 x TBE pufr použijte zcela polymerizovaný gel

* Pokud používáte materiál a přístroje tak, jak je zde popsáno, je změna parametrů amplifikace až tím posledním řešením. Ve většině případů lze vyhodnotit test odstraněním nadbytečných proužků podle rozdílu v délkách fragmentů.

7. Literatura

1. Bodmer, J., 1993. Immunogenetics **37**:79-94
2. Olerup, O., Zetterquist H., 1992. Tissue Antigens **39**:225-235
3. Olerup, O., Zetterquist H., 1993. Tissue Antigens **41**:55-56
4. Lu, Y.H. and Négre, S., 1993. Trends in Genetics **9**:297
5. Green and Sambrook, 2012. Molecular Cloning: A Laboratory Manual.
New York: Cold Spring Harbour Laboratory
6. Beutler, E. et al., 1990. BioTechniques **9**:166
7. Bunce, M., 1995. Tissue Antigens **46**:355-367
8. Sacchetti et al., 1997. Clin Chem **43**:2204-2206
9. Edwin Liu et al., 2005. Gastroenterology **128**:33.37
10. Husby et al., 2012. Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition **54**:136-160
11. Deutsches Ärzteblatt vom 10.03.2008
12. Mallal et al., Lancet 2002; 359: 727-732
13. Mallal et al., New England Journal of Medicine 2008; 358: 568-579
14. Menthon et al., Arthritis & Rheumatism 2009; 61:1287-1296; DOI 10.1002/art.24642
15. Nishino, S. et al., 2000. Sleep Medicine Reviews **4**:75-99
16. Mignot, E. et al., 2001. Am. J. Hum. Genet. **68**:686-699
17. Overeem, S. et al. 2008. Sleep Medicine Reviews **12**:95-107
18. Brewerton, DA et al., 1973. Lancet **i**:904-907
19. Schlosstien L et al., 1973. N. Engl. J. Med. 288:704-706

8. Použití in-vitro symbolů (IVD)

	Teplota skladování / teplotní omezení
	Teplota skladování / nejnižší povolená teplota
	Použijte do
	Viz návod k použití
	Dostatečný pro n testů
	Varování
	Výrobce
CONT	Obsahuje
CONTROL I CC	Kontaminační kontrola
HLA TYPING	Určeno pro HLA typizaci
eIFU	Elektronický návod k použití
HISTO TYPE INFORMATION CD	CD (obsahuje návod k použití, soubory pro vyhodnocení, certifikát kontroly kvality)
IVD	Pouze pro in-vitro diagnostické použití
LOT	Číslo šarže
OR	Nebo
PCRBUF I 10X	PCR pufr, 10x koncentrovaný
PCRCAP	PCR víčka
PCRFOIL	PCR fólie
PCRPLATE	PCR destičky
PCRSTRIP	PCR stripy
REACTIONMIX	Reakční mixy/směsi
REF	Katalogové číslo
RTU	Připraveno k použití
TAQ POLYMERASE	Taq polymeráza
WORKSHEET	Pracovní list

Návod k použití v jiných jazycích hledejte na: <http://www.bag-diagnostics.com> nebo na e-mailu info@bag-diagnostics.com, případně prostřednictvím tel.: +49 (0)6404-925-125

BAG Diagnostics GmbH
Na Hlinách 555/17, Praha 8, 182 00
Tel.: 286 840 508, Fax: 286 840 510, Mobil: 777 227 437
info@bag-diagnostics.cz, www.bag-diagnostics.cz