Instructions for Use:

Troubleshooting

دفترچه راهنمای استفاده از:

خطایابی

KBC
Kawsar Biotech Company

	مشکل احتمالی	علت احتمالی	راه حل	مشاهده نمونه
۱	عدم بالانس پیک ها	مقدار بیش از حد DNA	تکرار مجدد PCR با مقدار کم DNA	Pic1
		تعداد سیکل بالای PCR	تکرار مجدد PCR با تعداد سیکل مناسب	
۲	ارتفاع خیلی بلند پیک ها	غلیظ بودن محصول PCR	رقیق کردن محصول PCR و خوانش مجدد نمونه در دستگاه Genetic Analyzer	Pic2
۳	ارتفاع خیلی پایین پیک ها یا عدم تشخیص پیک ها	تخریب یا خرد شدن DNA	بررسی کیفیت DNA و در صورت نیاز استخراج مجدد DNA	Pic3
			افزایش سیکل PCR	
		خطا در رقت پرایمر	تغییر رقت پرایمر با کم یا زیاد کردن مقدار آن در Master Mix و تکرار مجدد PCR	
		پایین بودن مقدار DNA	تکرار مجدد PCR با مقدار DNA بیشتر	
			افزایش سیکل PCR	
		DNA ناهمگن مورد استفاده در PCR	همگن کردن DNA بوسیله پیپت میکس و اسپین کردن و تکرار مجدد PCR	

	مهارکننده های PCR	بررسی کیفیت DNA و در صورت لزوم تخلیص یا استخراج مجدد DNA با روش استاندارد	
		تغییر روش استخراج DNA	
		Purify کردن DNA جهت بازیافتن کیفیت مناسب با روش استاندارد	
		رقیق کردن DNA و استفاده از غلظت مناسب DNA	
		تکرار مجدد PCR و رعایت کردن موارد احتمالی از جمله آلودگی سطح کار به موادی همچون Bleach	
	فریز و دفریز کردن بیش از حد اجزاء PCR	الیکوت کردن اجزاء کیت به حجم های کمتر	
	میکس ناهمگن اجزا تشکیل دهنده Master Mix	ورتکس کردن تیوب حاوی Master Mix در حدود دو ثانیه و تکرار مجدد PCR	
	انجام PCR با مواد تاریخ مصرف گذشته	تکرار مجدد PCR و استفاده از مواد تازه	
		محصولات PCR را برای مدت طولانی و خارج از زمان تعیین شده ذخیره ننمایید.	

		شکل گیری حباب هوا در تیوب PCR		رفع کردن حباب موجود در تیوب PCR قبل از گذاشتن آن در دستگاه ترموسایکلر	
		پارامترهای نادرست برنامه دستگاه ترمو سایکلر		وارد کردن پارامترهای درست برنامه و تکرار مجدد PCR	
		عملکرد نادرست دستگاه ترمو سایکلر		تمیز کردن چاهک های دستگاه PCR به صورت دوره ای	
				در صورت رفع نشدن مشکل از دستگاه ترموسایکلر دیگری استفاده نمایید.	
۴	مشاهده پیک آلل اضافه برای مارکرهای STR	در یک یا دو محل	آلودگی، تریزومی کاذب یا Duplication (مناطق چند شکلی در توالی STR ها که باعث ایجاد الگوهای تریزومی Triallelic یا Diallelic در افراد سالم می شود)	فرد باید در کل محل های مورد بررسی در کیت تریزومی یا مونوزومی باشد و فقط با یک محل نمی توان تفسیر کرد.	Pic4
				بررسی نمونه DNA به منظور مشخص شدن این که آیا این پلیمورفیسم از والدین به ارث رسیده یا جهش جدید (De novo) می باشد. (جهش جدید گاهی به علت Partial chromosome imbalance اتفاق می افتد. اگر جهش جدید رخ داده باشد، لازم است تا مطالعات سیتوژنتیکی بر روی آن انجام شود و بسیار مهم است که ثابت شود پلیمورفیسم مشاهده شده اهمیت بالینی ندارد، زیرا گاهی داپلیکیشن ها با اختلال یادگیری یا فیزیکی همراه هستند.)	
				تکرار مجدد PCR	

			آلوده شدن نمونه جنینی با نمونه مادر	تکرار مجدد PCR در مواردی که آلودگی بیش از ۵۰٪ باشد.	
				بررسی همزمان نمونه DNA مادر و جنین	
			آلوده شدن مواد موجود در کیت	بررسی نمونه کنترل منفی یا نمونه فاقد DNA برای مشخص نمودن آلودگی احتمالی اجزاء کیت	
				الیکوت کردن اجزاء کیت به منظور جلوگیری از آلودگی	
			تشخیص اشتباه موزاییسم در نمونه های CVS در موارد Confined Placental Mosaicism (وجود تفاوت در ساختار کروموزومی جفت و جنین) و نمونه گیری نادرست از پرزهای جفتی	برای نمونه پرزهای جفتی، باید پرزهای جداگانه (Dissociated villi) از مناطق مختلف همچون Cytotrophoblast و Mesodermal تهیه شود. در صورتی که نمونه کم باشد و یا کیفیت پایین داشته باشد، بررسی پرزهای تک قابل قبول است.	
				لازم است که نمونه CVS پرزهای جفتی با دقت زیاد و توسط کارشناس آموزش دیده از نمونه‌های مادری تفکیک شود. چنانچه نمونه موزائیسم تشخیص داده شود، تایید با منشاء جنین لازم است.	
				CPM به راحتی قابل تشخیص نیست مگر اینکه هر دو نوع نمونه جفت و مایع آمنیوتیک برای تشخص و یا تایید نتیجه استفاده شود.	

		در بیش از دو محل	آلودگی یک نمونه با یک یا چند نمونه دیگر (DNA یاPCR Product)	استفاده از تیپ استریل و دستکش یکبار مصرف در هر مرحله به طور جداگانه	
				ذخیره جداگانه مواد مورد استفاده و تفکیک فضای کار قبل و بعد از PCR طبق استانداردهای بین المللی	
				بررسی تمام انتقال های تیوب به تیوب توسط فرد دوم چنانچه نتیجه تست نرمال نباشد، تکرار PCR یا بررسی همزمان نمونه DNA مادر و جنین	
				تمیز کردن محل کار را با وایتکس ۱۰٪ قبل از انجام هر آزمایش	
			آلوده شدن محیط آماده سازی یا محتویات کیت با محصول PCR	تفکیک فضای کار قبل و بعد از PCR طبق استانداردهای بین المللی	
۵	پدیده ADO (Allele Drop Out)	وجود SNP و یا در موارد نادرتری وقوع جهش تازه در محل اتصال پرایمر		تغییر دمای Annealing یا Extension و تکرار مجدد PCR به علت-primer site polymorphisms (PSPs) تکثیر متفاوت و برخلاف انتظار ناشی از پلی مورفیسم	Pic5
				انجام آزمایش بر روی والدین و مقایسه و تفسیر نتایج به دست آمده (در صورتی که در والدین SNP مشاهده نگردد، لازم است کیفیت DNA مورد بررسی قرار گیرد.)	
		کیفیت پایین DNA		بهبود کیفیت DNA با Purify کردن یا تخلیص مجدد DNA با روش استاندارد	

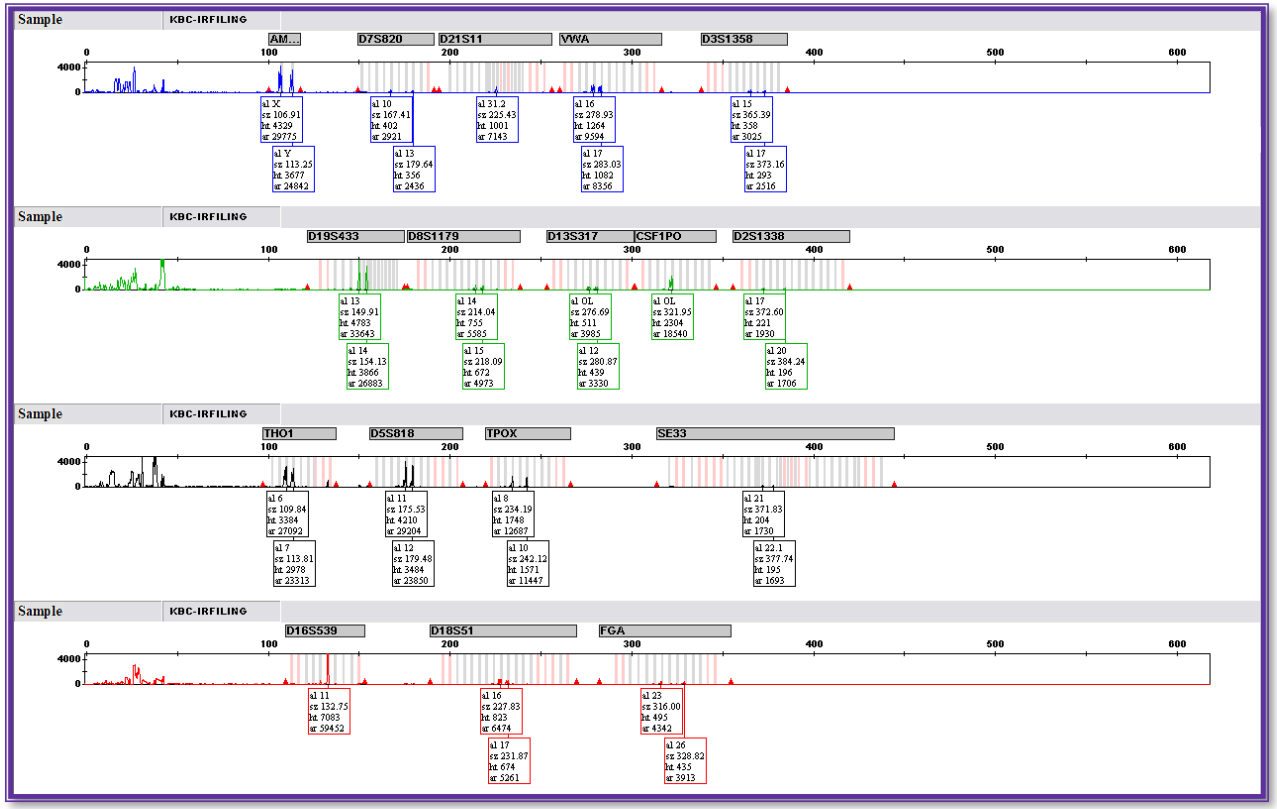
۶	محصولات غیر اختصاصی	Stutter Bands	سرخوردگی (Slippage) آنزیم DNA پلیمراز در قطعاتی که شامل توالی های تکراری می باشند باعث تولید محصولات اضافی می شوند که دقیقا یک تکرار کوچکتر یا بزرگتر از آلل STR اصلی می باشد.	تمیز دادن Stutter bands از پیک های اصلی هنگام تفسیر نتایج توسط فرد آنالیز کننده (نسبت باند stutter برای هر مارکر STR چهار تایی معمولا کمتر از ۱۵ درصد ارتفاع پیک اصلی است البته باتوجه به ماهیت توالی تکرار شونده این عدد می تواند متفاوت باشد.)	Pic6-1
		Dye Blob	رنگ‌های اضافی ناشی از تجزیه برچسب های رنگ فلورسنت متصل به پرایمرها در محیط، لکه رنگی در الکتروفروگرام ایجاد می کنند که می توانند با هر ارتفاعی به شکل پیک های پهن تری نسبت به پیک اصلی تشکیل شوند و آن را بپوشانند و معمولا در محدوده سایز ۸۰ تا ۱۹۰ دیده می شوند.	خوانش مجدد نمونه در دستگاه Genetic Analyzer	Pic6-2
		Pull-up (دیده شدن سایه پیک اصلی روی سایر رنگ ها)	مقدار بیش از حد DNA و به دنبال آن ارتفاع خیلی بالای پیک ها	رقیق کردن محصول PCR و خوانش مجدد نمونه در دستگاه Genetic Analyzer	Pic6-3
			نامناسب بودن Injection Time	Injection Time را کاهش دهید.	
			عدم انتخاب Dye set مناسب برای دستگاه و یا عدم کالیبراسیون دستگاه	کالیبراسیون مجدد دستگاه با ماتریکس مناسب و خوانش مجدد نمونه در دستگاه Genetic Analyzer	

		Spike (پیک های میخی شکل در یک، چند یا همه رنگ ها)	نوسان ولتاژ برق	خوانش مجدد نمونه در دستگاه Genetic Analyzer با ولتاژ مناسب	Pic6-4
			حباب های هوا جزئی در کپیلاری	پیروی از روش های ارائه شده توسط شرکت سازنده دستگاه برای واکنش دهنده و بهینه کردن نمونه	
			کریستال در پلیمر		
			ماده فلورسنت در پلیمر		
			کریستال در فرمامید		
			ماده فلورسنت در فرمامید		
۷	تکثیر رقابتی یا Preferential Amplification		مقدار بیش از حد DNA	تکرار مجدد PCR با مقدار کم DNA	Pic7
			تعداد سیکل بالای PCR	تکرار مجد PCR با تعداد سیکل مناسب	
				بهینه سازی واکنش با استفاده از DNA هایی با ژنوتیپ مشخص (DNA Control)	

۸	پدیده دو پیکی شدن	در Final Extension ناقص، نوکلئوتید A توسط آنزیم Taq پلیمراز در انتهای '3 تمام محصولات PCR اضافه نمی شود.	تکرار مجدد PCR با مقدار کم DNA حصول اطمینان از کامل شدن مراحل Final Extension و افزایش زمان آن در صورت لزوم تکرار مجدد PCR با کاهش تعداد سیکل	Pic8
۹	عدم وجود یا تشخیص سایز استاندارد توسط دستگاه	سایز استاندارد هنگام Run تعریف نشده و یا انتخاب سایز استاندارد نادرست	بررسی تنظیمات نرم افزار آنالیز	Pic9
		مقدار بیش از حد سایز استاندارد یا PCR Product	خوانش مجدد نمونه در دستگاه Genetic Analyzer با مقدار کمتر سایز استاندارد یا PCR Product	
		عدم وجود سایز استاندارد در well (چاهک)	آماده سازی مجدد نمونه و خوانش مجدد نمونه در دستگاه Genetic Analyzer	
		کپیلاری کهنه، پلیمر کهنه، قطع جریان، نشتی، جایگزین شدن نمک، Dye و یا نمونه DNA با سایز استاندارد (در واقع به علت بالا بودن غلظت این مواد پیک اضافی در سایز استاندارد ایجاد می شود که باعث عدم تطبیق سایز استاندارد با نمونه می گردد)	آماده سازی نمونه جدید با رعایت مقدار مناسب DNA، نمک و Dye و خوانش مجدد نمونه در دستگاه Genetic Analyzer	

۱۰	شناسایی نادرست پیک های سایز استاندارد	تنظیمات مربوط به سایز استاندارد	بررسی تنظیمات نرم افزار آنالیز	Pic10
۱۱	Cut-off پیک های سایز استاندارد	Run کوتاه مدت	افزایش مدت زمان Run در تنظیمات دستگاه Genetic Analyzer	Pic11
۱۲	تعداد بالای پیک (نویز) در محدوده ۲۵ تا ۵۰ جفت باز ابتدایی	شروع شدن رنج آنالیز با Fragment هایی با قطعات کوتاه	تعریف سایز ۷۰ جفت باز به بعد جهت خوانش نمونه ها در نرم افزار	Pic12
۱۳	ارتفاع خیلی پایین یا عدم وجود پیک های سایز استاندارد و پیک الل ها	غلظت پایین سایز استاندارد	خوانش مجدد نمونه در دستگاه Genetic Analyzer با مقدار بیشتر سایز استاندارد	Pic13
		حجم چاهک کمتر از 10 µL	خوانش مجدد نمونه در دستگاه Genetic Analyzer با مقدار بیشتر نمونه	
		ایجاد حباب یا حباب هایی در پایین چاهک	خوانش مجدد نمونه در دستگاه Genetic Analyzer همراه با حباب گیری چاهک ها	
		مشکل در Injection (تزریق)	تکرار مجدد Injection یا افزایش زمان Injection و در نهایت خوانش مجدد نمونه در دستگاه Genetic Analyzer	
		Tubing blocked ناشی از ناخالصی بافر، بافر قدیمی، مقدار کم بافر یا عدم وجود بافر در نمونه و یا وجود حباب در پلیمر	تعریف ولتاژ و دمای مناسب برای قسمت الکتروفورز دستگاه زیرا تعریف کردن مقادیر پایین تر می تواند موجب تشکیل حباب در پلیمر گردد. همچنین اضافه کردن بافر جدید و حذف حباب از ستون و در نهایت خوانش مجدد نمونه در دستگاه Genetic Analyzer	
		کپیلاری کهنه یا معیوب	خوانش مجدد نمونه در دستگاه Genetic Analyzer با کپیلاری جدید	

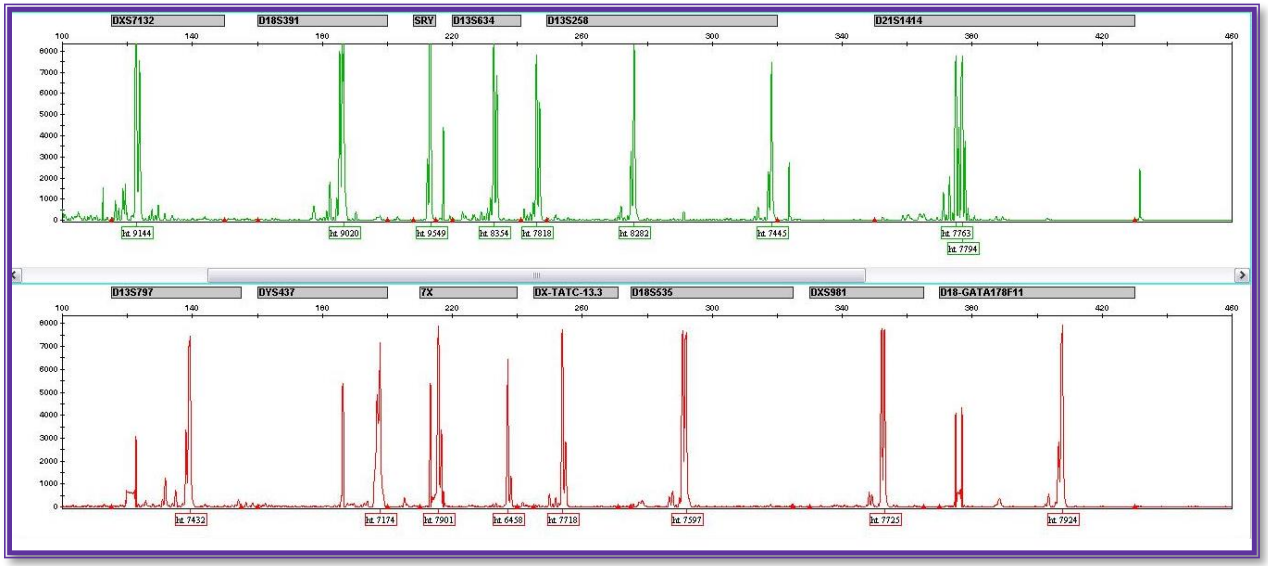
عدم بالانس پیک ها



شکل شماره ۱: Pic1

همانطور که مشاهده می نمایید، هیچ بالانسی میان پیک ها برقرار نمی باشد. به طور مثال در ردیف اول (پیک های آبی رنگ)، محل AMXY دارای ارتفاعی در حدود ۴۰۰۰ می باشد در حالی که محل D7S820 با ارتفاعی در حدود ۴۰۰ ، محل های VWA و D21S11 با ارتفاعی در حدود ۱۰۰۰ و نهایتاً محل D3S1358 با ارتفاعی در حدود ۳۰۰ نشان می دهد.

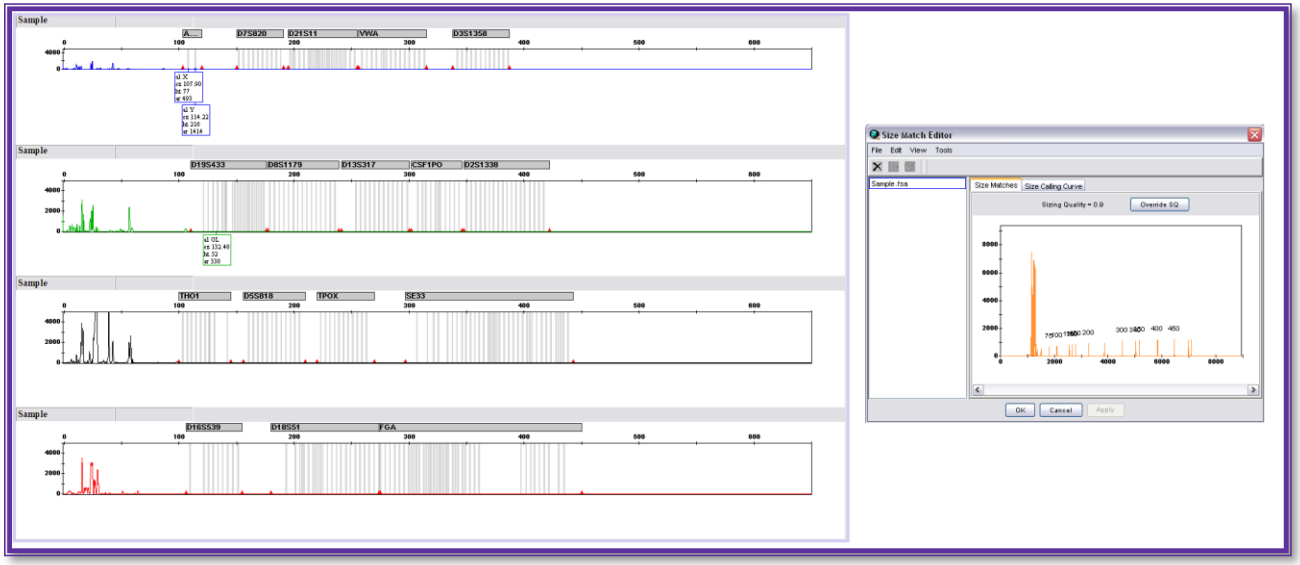
ارتفاع خیلی بلند پیک ها



شکل شماره ۲: Pic2

همانطور که مشاهده می نمایید تمامی پیک ها ارتفاعی در حدود ۸۰۰۰ دارند که ارتفاع نسبتا بالایی است و به دلایل ذکر شده ایجاد می گردد.

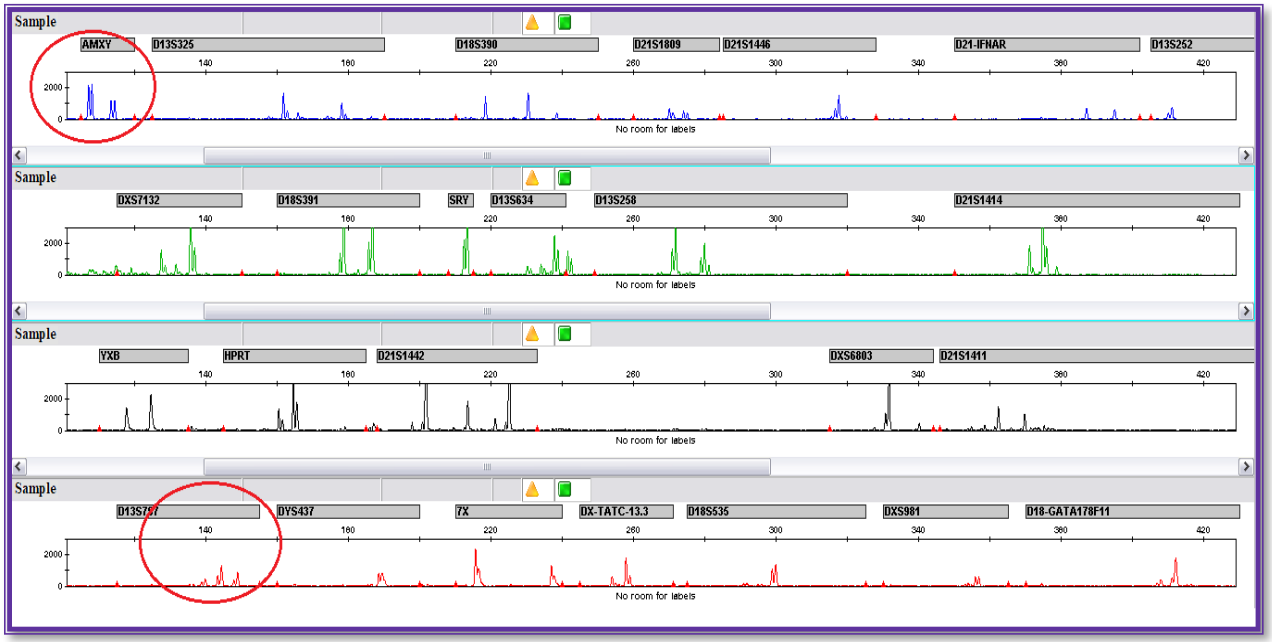
ارتفاع خیلی پایین پیک ها یا عدم تشخیص پیک ها



شکل شماره ۳: Pic3

همانطور که مشاهده می نمایید در عکس سمت راست (جهت باز کردن این پنجره Size Match Editor می توانید به راهنمای فرآیند کپیلاری الکتروفورز مراجعه فرمایید)، ارتفاع سایز استاندارد نرمال است در حالی که در Result نمونه (عکس سمت چپ)، ارتفاع پیک ها بسیار پایین بوده مانند محل AMXY و در بعضی محل ها مانند محل D7S620 کار نکرده است.

مشاهده پیک آلل اضافه برای مارکرهای STR



شکل شماره ۴: Pic4

همانطور که مشاهده می نمایید در اکثر محل ها عدم بالانس بین دو الل یا بیش از دو پیک با ارتفاع متفاوت در مارکرها مشاهده می شود که این نتیجه نمی تواند نشان دهنده تریزومی باشد از آنجایی که نسبت مساحت پیک ها منطبق با تریزومی نیست و همچنین در تمامی کروموزوم ها این الگو دیده شده به علاوه در محل AMXY ارتفاع X دو برابر Y است. در نمونه های جنینی مذکر با بررسی نسبت بین محصول X و Y در محل AMXY میتوان مشخص نمود که نمونه غالب مربوط به جنین است یا مادر و در نمونه های جنینی مونث نتیجه باید با پروفایل مادر مقایسه شود. در محل D13S797 سه پیک دیده می شود (که با دایره قرمز رنگ نمایش داده شده است) که ارتفاع پیک میانی بلندتر از دو پیک دیگر می باشد که نشان دهنده الل مشترک بین مادر و جنین است.

پدیده ADO

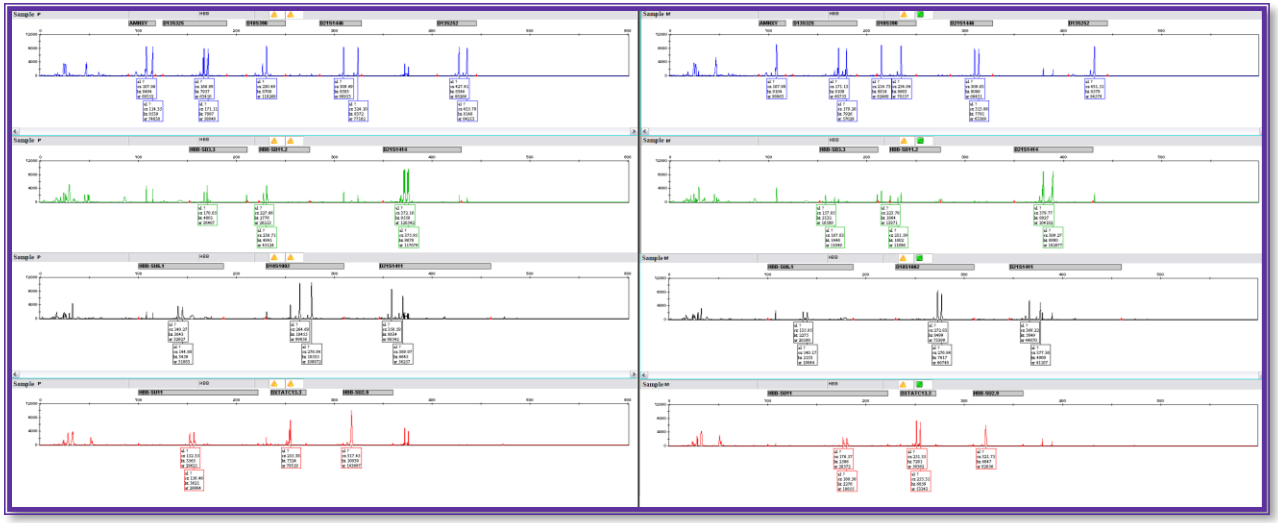
(Allele Drop Out)

از دست رفتن یک الل در طول تکثیر DNA بوسیله فرآیند PCR، Allelic dropout (ADO) می نامند که باعث می گردد فرد برای آن محل به طور غلط به جای هتروزیگوت، هموزیگوت تشخیص داده می شود.

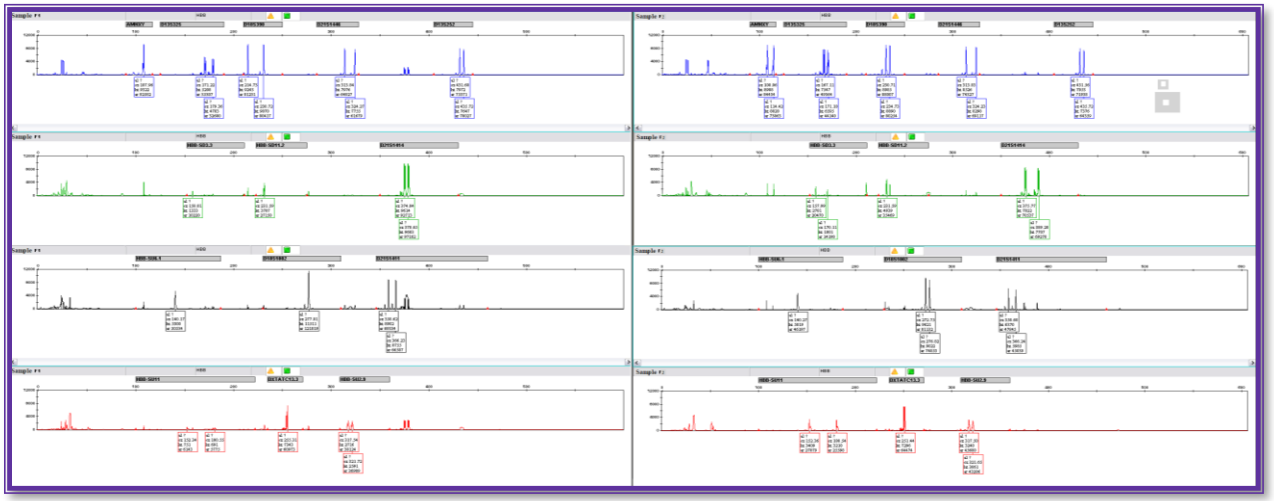
جهت تشخیص ADO نمی توان به Result نمونه به تنهایی بسنده کرد و حتما باید با رسم هاپلوتایپ و مقایسه سایز الل های هر محل با پدر و مادر فرد پی به آن برد.

همانطور که مشاهده می نمایید در بررسی نمونه جنین که در مثال زیر آورده شده است با پدر و مادر آن و با رسم هاپلوتایپ مشخص گردیده که نمونه جنین در محل SD3.3 دارای یک پیک با سایز ۱۵۸ می باشد در حالی که نمونه مادر دارای دو پیک با سایزهای ۱۵۸ و ۱۶۷ و نمونه پدری دارای یک پیک با سایز ۱۷۰ می باشد که در نتیجه جنین F1 تنها یک الل با سایز ۱۵۸ از مادر خود دریافت کرده باشد و در واقع الل دیگر خود را طی پدیده ADO از دست داده است.

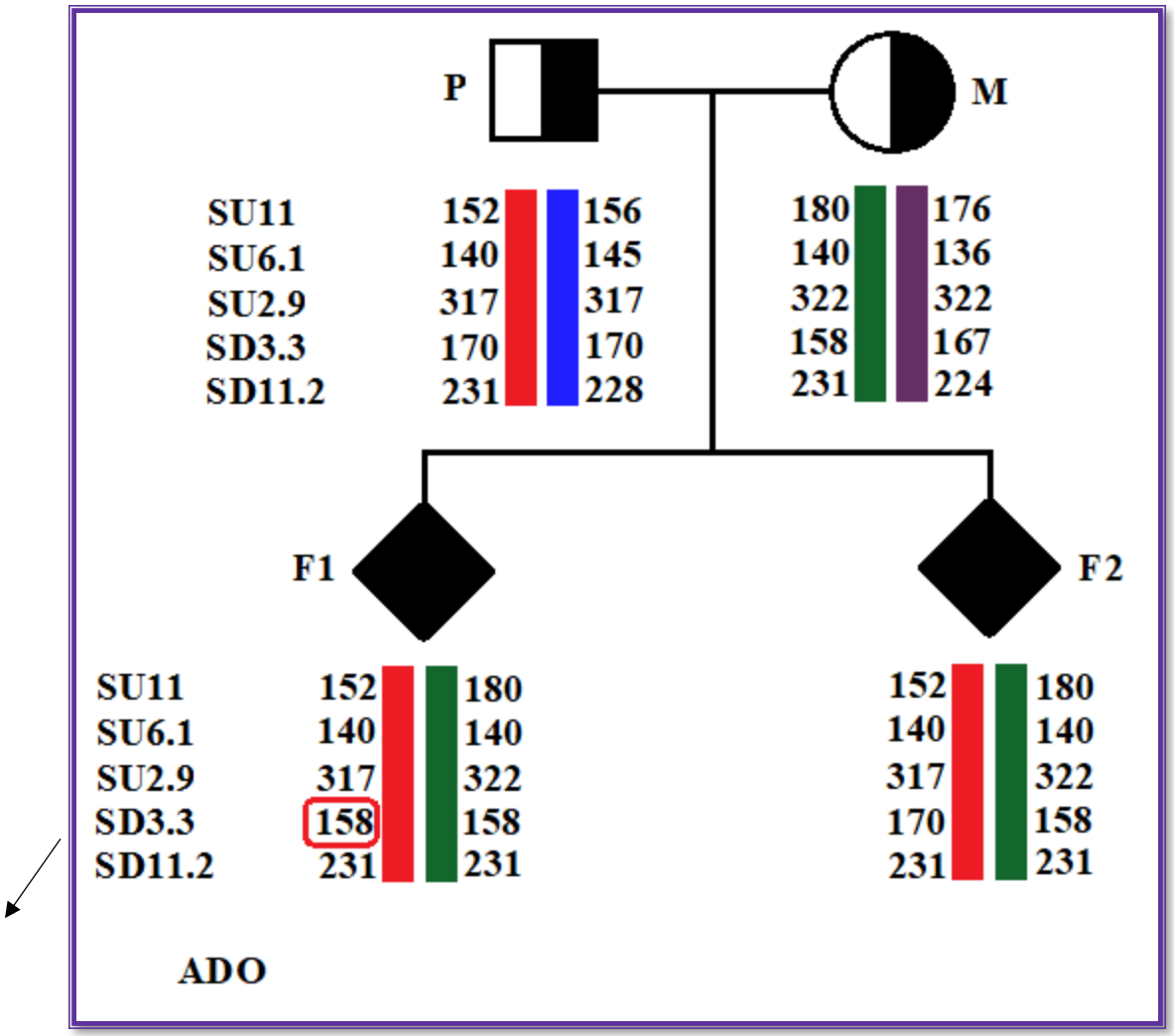
همچنین با بررسی جنین دیگر که همان پروفایل را دارد و این الل را از دست نداده است و دارای دو پیک با سایزهای ۱۵۸ و ۱۷۰ می باشد، موجب تایید این تشخیص می گردد.



شکل شماره ۴: نتیجه پدر و مادر ناقل HBB

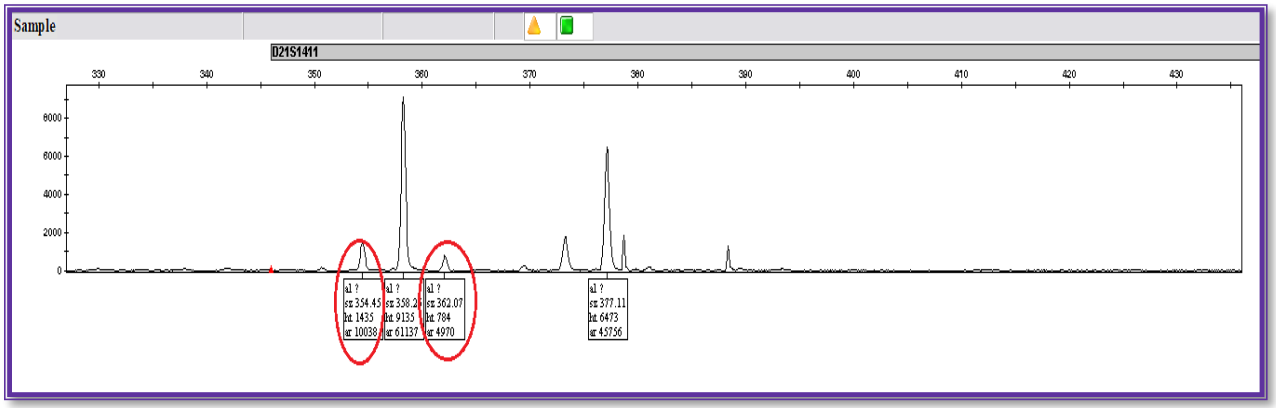


شکل شماره ۵: نتیجه جنین ۱ و ۲ ناقل HBB



شکل شماره ۶: Pic5

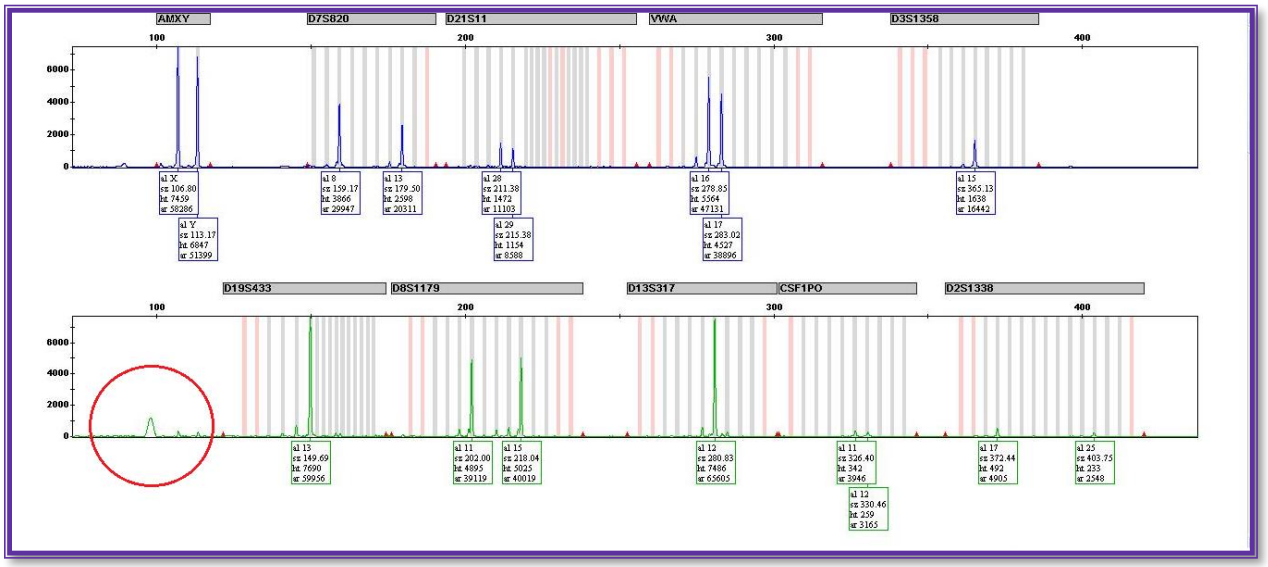
Stutter Bands



شکل شماره ۷: Pic6-1

در یک STR با ۴ جفت باز می توان شاهد Stutter با ۴ جفت باز کوتاهتر یا بلندتر در اطراف باند اصلی بود. همانطور که مشاهده می نمایید، در محل D21S1411 یک پیک اصلی با سایز ۳۵۸ وجود داشته و در دوطرف آن دو Stutter (که با دایره قرمز رنگ نمایش داده شده است) با سایز های ۳۵۴ و ۳۶۲ می باشد.

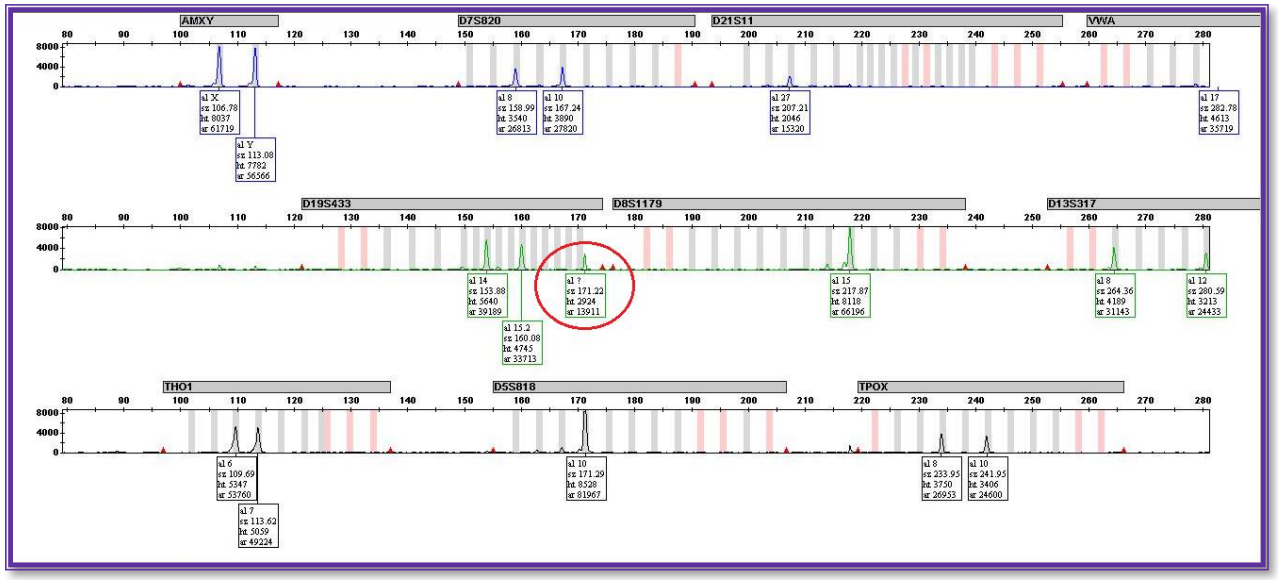
Dye Blob



شکل شماره ۷: Pic6-2

همانطور که در شکل مشاهده می نمایید به دلیل رنگ اضافه، پیک پهنی (که با دایره قرمز رنگ نمایش داده شده) تشکیل شده است. در این Result نمونه این پیک در محدوده خارج از محل های کیت تشکیل گردید بنابراین مشکلی ایجاد نمی نماید اما این امکان وجود دارد که در محل ها و بر روی پیک اصلی شکل گیرد.

Pull-up

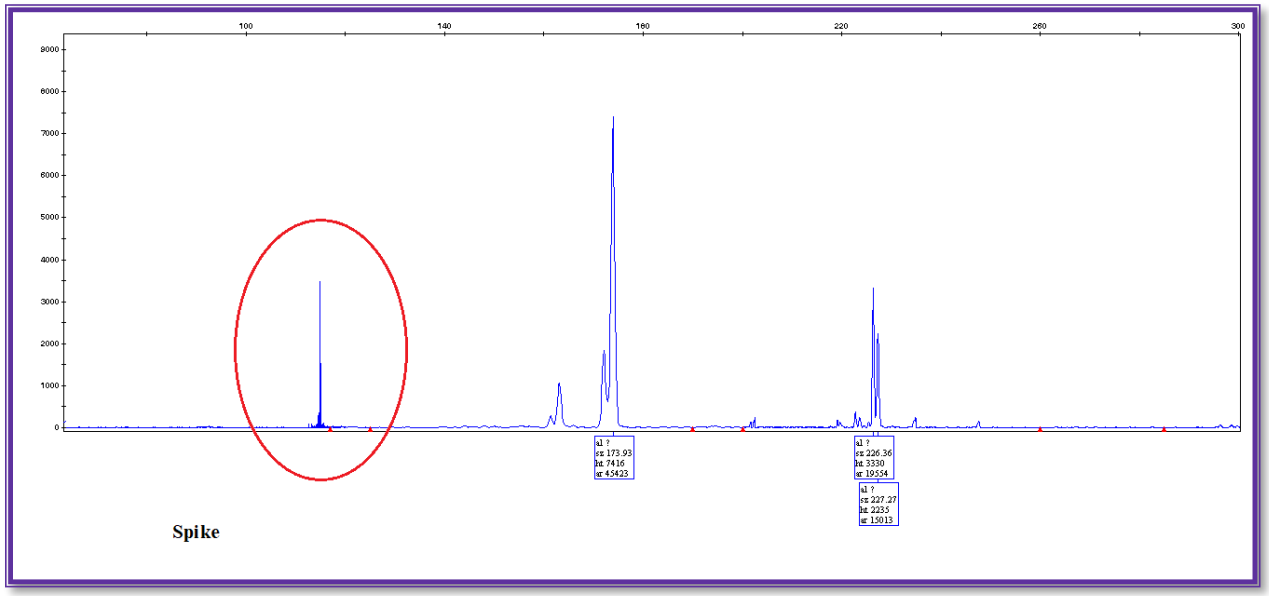


شکل شماره ۸: Pic6-3

Pull-up در واقع یک مشکل نرم افزاری است که در عدم تمایز بین رنگ های مختلف استفاده شده در طول تست ایجاد می گردد.

به طور مثال یک پیک مشاهده شده در یک رنگ (پیک مشکی رنگ محل D5S818 با سایز ۱۷۱ در Result بالا) توسط سنسور برای یک رنگ دیگر (پیک سوم محل D19S433 با سایز ۱۷۱) ، ثبت می شود و پیک دومی را ایجاد می کند که اصلی نمی باشد و به عنوان سایه در نظر گرفته می شود. این پیک ها می تواند از ارتفاع قابل توجهی به عنوان یک آلل واقعی برخوردار باشد و این خطر وجود دارد که به عنوان پیک اصلی توسط کاربر تشخیص داده شود و منجر به خطا در تشخیص شود. بنابراین ضروری است که در حین آنالیز به آن ها توجه شود.

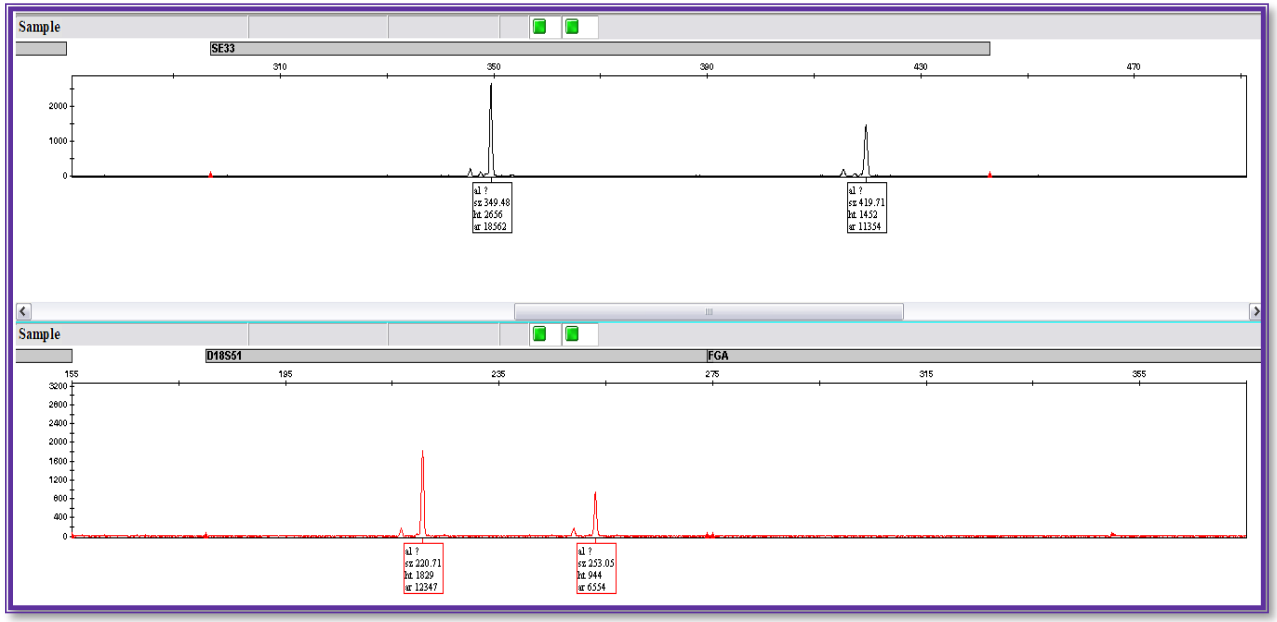
Spike



شکل شماره ۹: Pic6-4

همانطور که مشاهده می نمایید Spike یه صورت یک پیک میخی است و کاملا با شکل پیک طبیعی که دارای قله می باشد متفاوت است. به طور کلی این رخداد در یک موقعیت یکسان و در همه رنگ ها دیده می شود. اگرچه که می تواند در یک رنگ مشاهده شود.

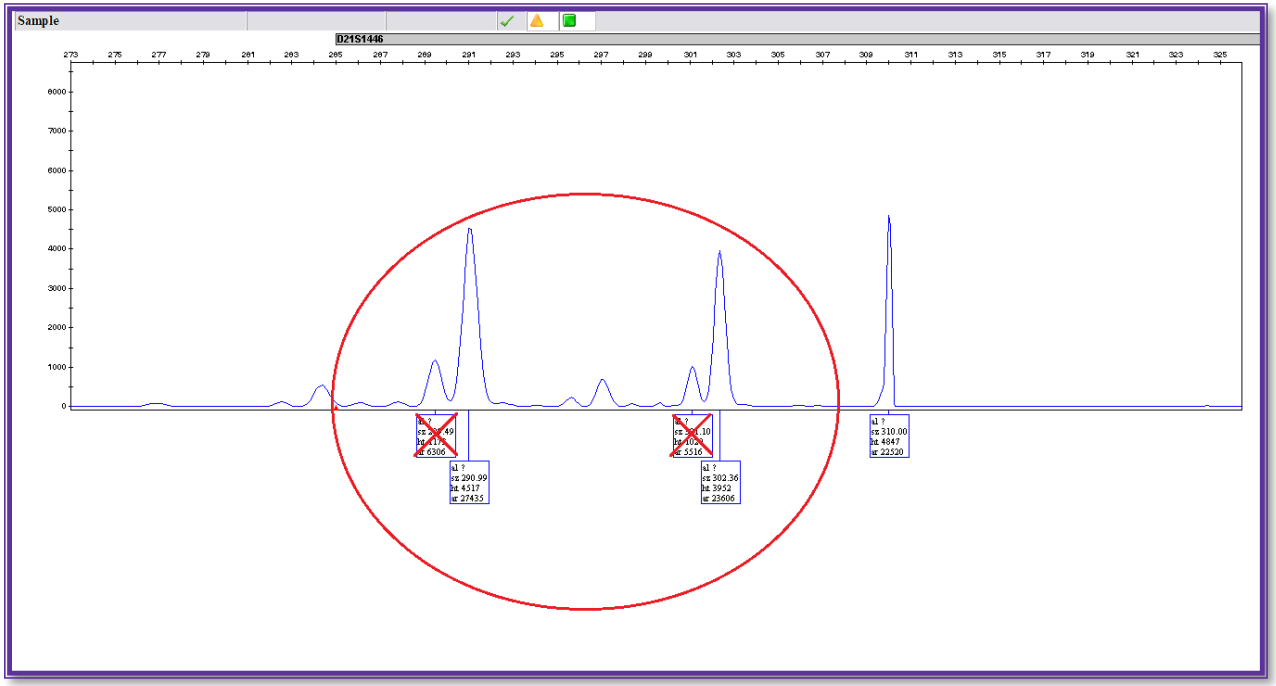
تکثیر رقابتی یا Preferential Amplification



شکل شماره ۱۰: Pic7

تکثیر رقابتی هنگامی رخ می دهد که دوپیک در حدود ۲۰ جفت باز یا بیشتر از یکدیگر فاصله داشته باشند و ارتفاع پیک سمت چپ در مقایسه با پیک سمت راست اختلاف آشکاری داشته باشد. بنابراین با راه حل ارائه شده می توان این مشکل را رفع کرد. به طور مثال همانطور که در شکل مشاهده می نمایید در محل SE33 دو پیک اصلی در حدود ۷۰ جفت باز با یکدیگر فاصله داشته و این موجب افزایش ارتفاع پیک سمت چپ (با ارتفاع ۲۶۵۶) در مقایسه با پیک سمت راست (با ارتفاع ۱۴۵۲) شده است. همچنین در محل D18S51 دوپیک با اختلاف ۳۰ جفت باز، پیک سمت چپ دارای ارتفاعی دو برابر پیک سمت راست را نشان می دهد.

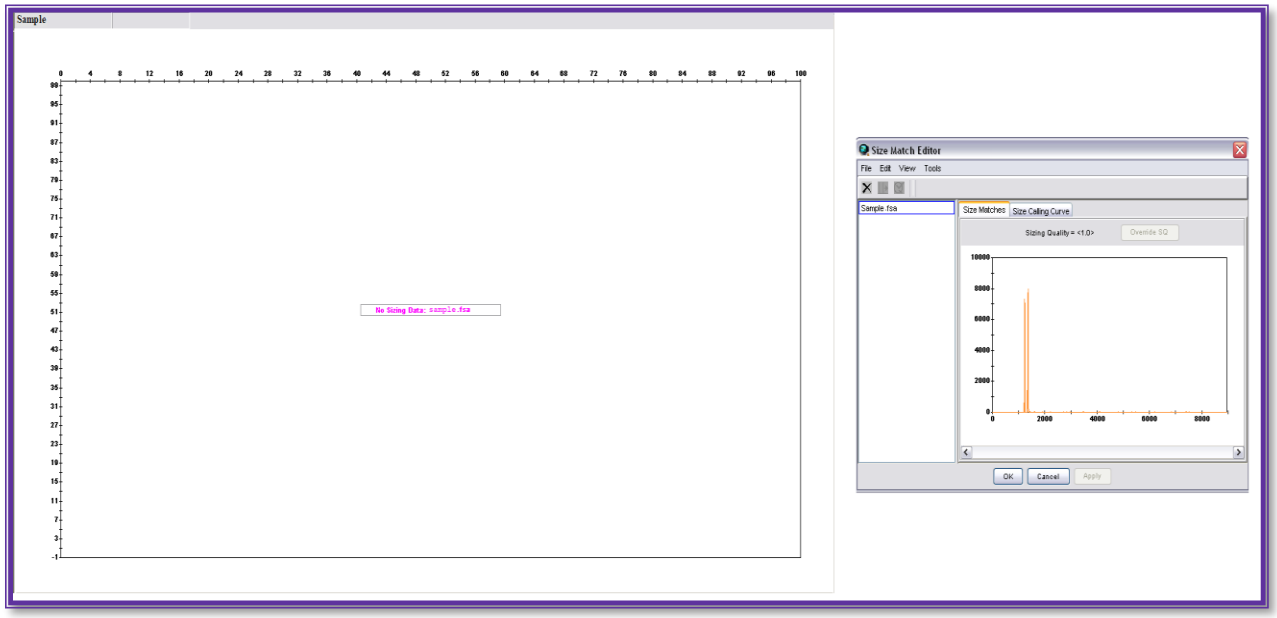
پدیده دو پیکی شدن



شکل شماره ۱۱: Pic8

همانطور که مشاهده می نمایید دو پیکی شدن با دایره قرمز رنگ نمایش داده شده است. در این واقع یکی از پیک ها را با توجه به سایز و ارتفاع آن به عنوان پیک اصلی در نظر گرفته و دیگری حذف می گردد.

عدم وجود یا تشخیص سایز استاندارد توسط دستگاه

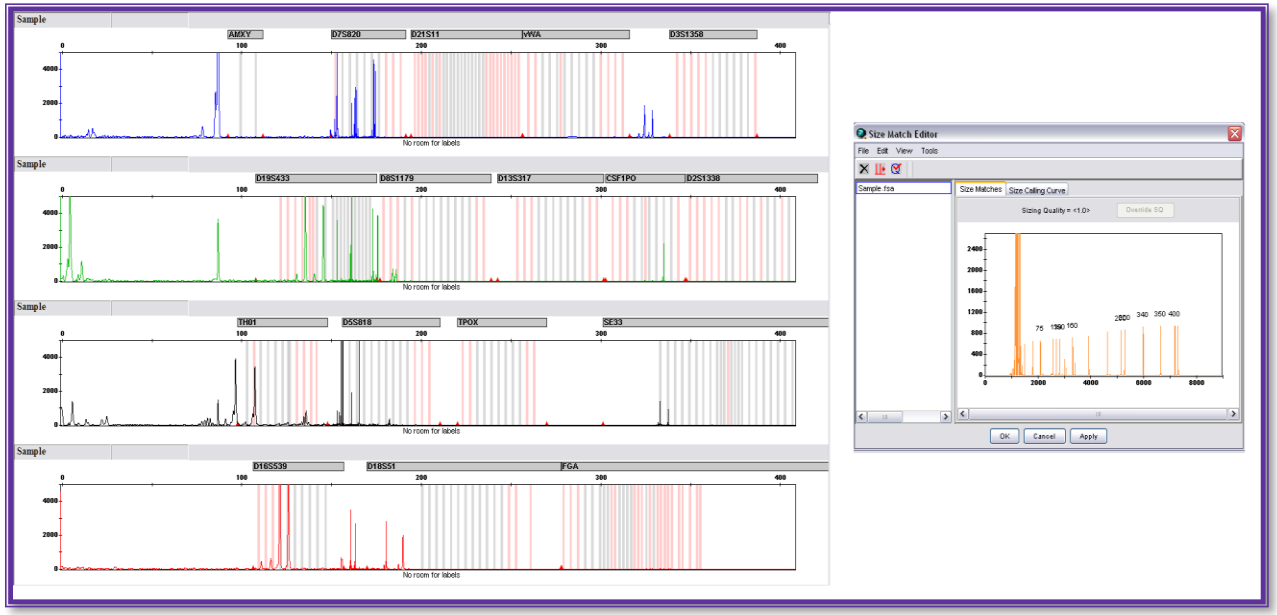


شکل شماره ۱۲: Pic9

همانطور که مشاهده می نمایید در پنجره Size Match Editor (عکس سمت راست) سایز استاندارد تعریف نشده است بنابراین به طبع هنگام باز کردن پنجره Result نمونه (عکس سمت چپ) با پیغام No Sizing Data مواجه می شوید.

جهت باز کردن پنجره Size Match Editor می توانید به راهنمای فرآیند کپیلاری الکتروفورز مراجعه فرمایید.

شناسایی نادرست پیک های سایز استاندارد

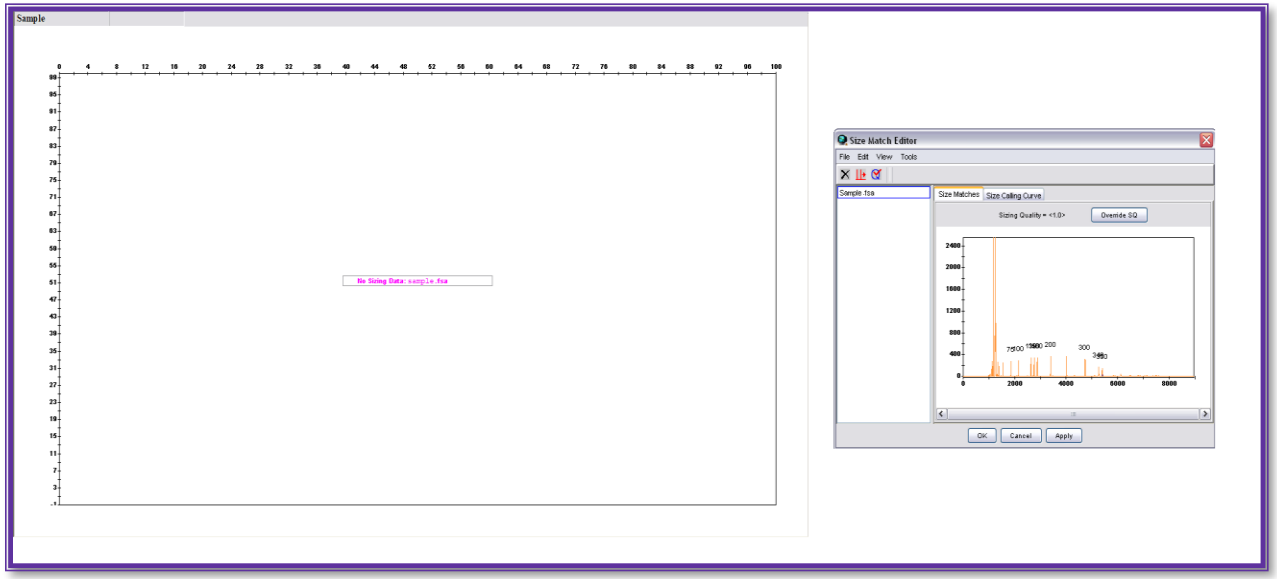


شکل شماره ۱۳: Pic10

همانطور که مشاهده می نمایید در پنجره Size Match Editor (عکس سمت راست) پیک های سایز استاندارد مشاهده شده است در حالی که به هنگام باز کردن پنجره Result نمونه، پیک ها در رنج تعریف شده به عنوان پنل قرار نگرفته اند. بنابراین سایز استاندارد در نرم افزار نیاز به اصلاح دارد.

جهت باز کردن پنجره Size Match Editor می توانید به راهنمای فرآیند کپیلاری الکتروفورز مراجعه فرمایید.

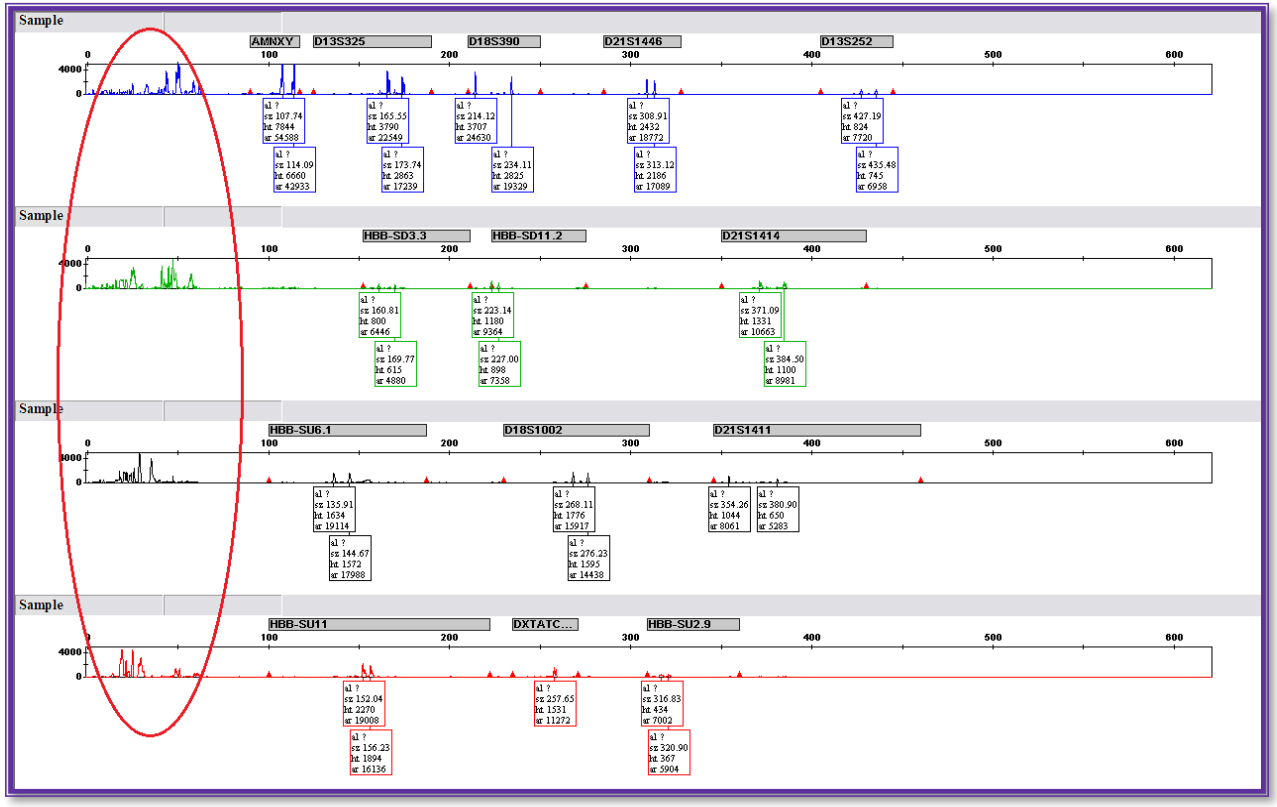
پیک های سایز استاندارد Cut-off



شکل شماره ۱۴: Pic11

همانطور که مشاهده می نمایید در پنجره Size Match Editor (عکس سمت راست)، سایز استاندارد از سایز ۳۵۰ به بعد کار نکرده است و در اصطلاح cut off شده است. بنابراین Result نمونه (عکس سمت چپ) پیغام No Sizing Data را نمایش می دهد.

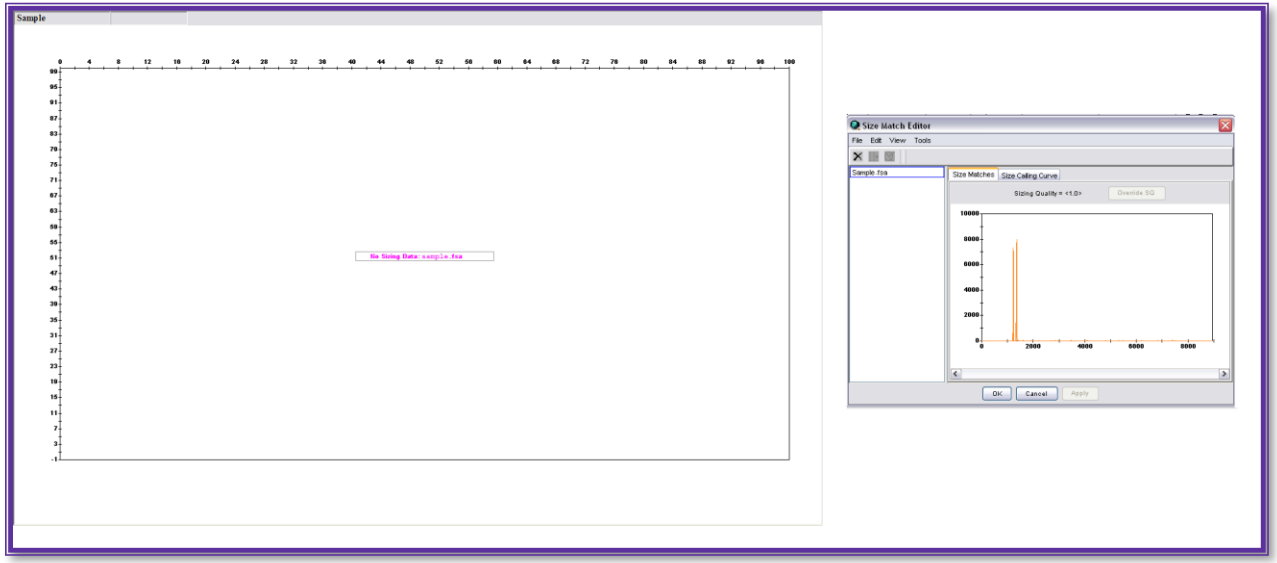
تعداد بالای پیک (نویز) در محدوده ۲۵ تا ۵۰ جفت باز ابتدایی



شکل شماره ۱۵: Pic12

همانطور که مشاهده می نمایید در قسمت ابتدایی Result نمونه در محدوده ۲۵ تا ۵۰ جفت باز که با دایره قرمز رنگ مشخص گردیده، پیک ها را جهت آنالیز مورد بررسی قرار نداده که در واقع پرایمر و پرایمر دایمر است و به عنوان نویز محسوب می شود.

ارتفاع خیلی پایین یا عدم وجود پیک های سایز استاندارد و پیک الل ها



شکل شماره ۱۶: Pic13

همانطور که مشاهده می نمایید علاوه بر اینکه سایز استاندارد در پنجره Size Match Editor (عکس سمت راست) به خوبی کار نکرده است هیچ داده ای هم در پنجره Result نمونه (عکس سمت چپ) مشاهده نمی گردد و پیغام No Sizing Data را مشاهده می کنید.

جهت باز کردن پنجره Size Match Editor می توانید به راهنمای فرآیند کپیلاری الکتروفورز مراجعه فرمایید.

جهت مشاهده راهنمای آموزش تخصصی آنالیز بر روی لینک کلیک نمایید.

اطلاعات تماس

تهران، خیابان ولیعصر، بالاتر از فاطمی، خیابان مجلسی، پلاک ۴۱، طبقه ۳، شرکت زیست فناوری کوثر

۱۵۹۵۶۴۵۵۱۳

۰۲۱۸۸۹۳۹۱۵۰ - ۸۸۹۳۰۱۴۳-۵

۰۲۱۸۸۹۳۹۱۳۹

kbc@kawsar.ir

kawsar_biotech@yahoo.com